مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال بیست و هشتم/شماره ۱۱۰/مهر ۱۳۸۹

مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۸۸/۸/۳ تاریخ پذیرش: ۸۹/۵/۲۴

تولید رده‌ی سلولی پایدار از سلول‌های P19 تولید کننده‌ی PTS2- EGFP

مرضیه موج بافان[۱]، دکترکامران قائدی[۲]، دکتر شهناز رضوی[۳]، فرشته کرمعلی[۴]، خدیجه کربلایی[۴]، سمیه تنهایی[۴]، فرزانه ربیعی[۴]، دکتر محمد حسین نصر اصفهانی[۵]، دکتر حسین بهاروند[۶]

خلاصه

مقدمه: سلول‌های P19 سلول‌های کارسینوماهای جنینی موشی هستند که از نظر تکوینی پرتوان بوده، همانند سلول‌های جنینی طبیعی قادر به تمایز هستند. برخی خصوصیات سلول‌های P19، آن‌ها را برای بررسی وقایع اولیه تکوین ارزشمند می‌سازد.

روش‌ها: وکتور بیانی pUcD2.hygro.PTS2-EGFP به سلول‌های P19 ترانسفکت گردید؛ سپس با استفاده از آنتی‌بیوتیک هیگرومیسین کلونی‌های سلولی رشد یافته‌ی مقاوم به آنتی‌بیوتیک انتخاب شده، با روش‌های مختلف خصوصیات سلولی آن‌ها بررسی گردید.

یافته‌ها: بررسی‌های RT-PCR نمایانگر بیان ژن EGFP در این سلول‌ها است و مطالعات ایمونوسیتوشیمی نیز مؤید حفظ حالت پرتوانی سلول‌های ترانسفکت شده می‌باشد.

نتیجه‌گیری: از آن جایی که سلول‌های P19 قادرند به راحتی به سلول‌های مختلف تمایز یابند، با استفاده از این رده‌ی سلولی، تغییرات ایجاد شده در پراکسی‌زوم‌ها در حین تمایز این رده‌ی سلولی قابل ارزیابی است.

واژگان کلیدی: لیپوفکشن، P19، پلاسمید، RT-PCR، پراکسی زوم.

مقدمه

سلول‌های یوکاریوتی می‌توانند تحت شرایط مناسب، DNA خارجی را کسب کنند و DNA کسب شده می‌تواند در هسته جای گیرد. این پدیده در جهت کسب بیان گذرا و پایدار ژن‌های گوناگون استفاده می‌شود (۱). ترانسفکشن به دو نوع اصلی تقسیم می‌شود: گذرا و پایدار. ترانسفکشن گذرا، موقت است و بیان ژن خارجی فقط برای چندین روز به طول می‌انجامد و سپس از بین می‌رود؛ چرا که DNA به داخل ژنوم سلول میزبان ادغام نشده است. در عوض، ترانسفکشن پایدار با فرکانس کمتر رخ می‌دهد (۱۰۰-۱۰ برابر کمتر)، اما بیان آن به مدت طولانی حفظ می‌شود؛ چرا که DNA خارجی در ژنوم میزبان ادغام می‌شود (۲). در تحقیق حاضر از سلول‌های P19 استفاده شد که همانند دیگر کارسینوماهای جنینی و سلول‌های بنیادی جنینی، این سلول‌ها نیز از نظر تکوینی پرتوان هستند و همانند سلول‌های جنینی طبیعی قادر به تمایز می‌باشند (۴-۳). در این تحقیق از سلول‌های P19 جهت بیان پایدار

[۱] دانشجوی فوق لیسانس، گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.
[۲] استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان و پژوهشکده‌ی رویان، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، اصفهان، ایران.
[۳] دانشیار، گروه آناتومی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
[۴] گروه سلول‌های بنیادی و زیست شناسی تکوینی، پژوهشکده‌ی رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، تهران، ایران.
[۵] دانشیار، گروه زیست شناسی تکوینی، پژوهشکده‌ی رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، ، اصفهان، ایران.
[۶] دانشیار، گروه سلول‌های بنیادی و زیست شناسی تکوینی، پژوهشکده‌ی رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، تهران، ایران.
نویسنده‌ی مسؤول: دکترکامران قائدی: استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان و پژوهشکده‌ی رویان، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، اصفهان، ایران.
Email: kamranghaedi@royaninstitute.org

www.mui.ac.ir

(Enhanced Green Fluorescent Protein) EGFP متصل به سیگنال PTS2 (Peroxisomal Targeting Signal Type II) استفاده گردید. دومین سیگنال هدایت کننده‌ی پراکسی زومی نوع ۲ (PTS2) یک نانوپپتید است که در انتهای آمینی پروتئین‌های ماتریکس پراکسی‌زوم واقع شده است. این سیگنال شامل توالی حفاظت شده‌ی (R/K)(L/V/I)X5(H/Q)(L/A) می‌باشد و در تعداد کمی از پروتئین‌های ماتریکس مثل ۳-کتواسیل-کوآتیولاز حضور دارد (۵). بنابراین قرار گرفتن EGFP فرودست PTS2 باعث هدایت این پروتئین پس از سنتز به پر اکسیزوم‌های سلول و تابش رنگ سبز فلورسنت از آن‌ها خواهد شد.

در تحقیقی که در سال ۲۰۰۰ انجام گرفت، از نوعی سلول CHO (Chinese hamster ovary) استفاده گردید که این سلول‌ها به صورت پایدار با PTS2-EGFP ترانسفکت شده، جهت بررسی مکانیسم مولکولی بیوژنز پراکسی‌زوم‌ها استفاده شد (۶).

در این مطالعه پلاسمید pUcD2.hygro.PTS2-EGFP، که در آن پروموتر SR-α ویروسی فرادست EGFP– PTS2 قرار دارد و دارای ژن مقاومت به هیگرومایسین B می‌باشد با روش لیپوفکشن وارد سلول‌های P19 شد و رده‌ی سلولی واجد بیان پایدار ژن گزارشگر EGFP ایجاد گردید. بنابراین از این رده‌ی سلولی می‌توان در جهت بررسی تغییرات ایجاد شده در مرفولوژی و تحرکات پراکسی‌زوم‌ها هنگام تمایز عصبی سلول‌های P19 استفاده نمود.

روش‌ها

آماده سازی و تکثیر پلاسمید: در ابتدا وکتور بیانی pUcD2.hygro.PTS2-EGFP (۷) از طریق شوک حرارتی به سلول‌های *E.Coli* که به صورت شیمیایی مستعد شده بودند، وارد گردید و پس از رشد و تکثیر سلول‌های باکتریایی حاوی پلاسمید، DNA پلاسمیدی از طریق کیت استخراج پلاسمید QIAprep Miniprep (Qiagen) استخراج شد.

کشت سلولی: سلول‌های P19 از مؤسسه‌ی رویان اصفهان تهیه و کشت گردید (۸). سلول‌ها در فلاسک‌های T25cm2 در محیط کشت مخصوص سلول‌های P19، که شامل DMEM (Gibco:12800-116, USA) همراه با ۱۰٪ ES.FCS (Gibco:10439-024, USA)، ۱٪ گلوتامین و ۱٪ پنی‌سیلین-استرپتومایسین و بتا مرکاپتواتانول است، در شرایط ̊C ۳۷، ۵٪ CO_2 و ۹۰٪ رطوبت انکوبه گردید تا به تراکم ۸۰-۷۰ درصد برسد.

RT-PCR RNA با استفاده از کیت RNeasy (Qiagen, German) استخراج شد و پس از تیمار با آنزیم DNase I سنتز cDNA با استفاده از کیت Revert Aid H Minus first strand cDNA synthesis kit (Fermentas) انجام گردید. سنتز cDNA با استفاده از ۲ µg از RNA کل، پرایمر $oligo\text{-}d\ (T)_{18}$ و آنزیم M-MuLV Reverse Transcriptase صورت گرفت. برای بررسی پروفایل بیان ژن‌های مد نظر واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی هر ژن، که توسط سایت Primer3 طراحی شده، برای اطمینان از اختصاصی بودن، Blast شد، انجام گردید. این پرایمرها عبارتند از:

پرایمر Oct4 موشی با توالی forward 5'CACGAGTGGAAAGCAACTCAG3' و توالی 5' CTGGGAAAGGTGTCCCTGTAG 3' reverse و پرایمر Nanog با توالی forward

www.mui.ac.ir

5'AAGTACCTCAGCCTCCAGCA3' و توالی 5' GAAGTTATGGAGCGGAGCAG 3' reverse پرایمر EGFP با توالی forward

5'ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG3' و توالی 5' ATTACTTGTACAGCTCGTCCATG 3' reverse پرایمر β-tubulin با توالی forward

5'TGTTACCAACTGGGACGACA3' و توالی 5' TCTCAGCTGTGGTGGTGA3' reverse

ترانسفکشن DNA: ۲۴ ساعت قبل از تمایز، سلول‌های تمایز نیافته‌ی P19 در دیش‌های ۲۴ خانه به تعداد ۷۵۰۰ عدد کشت داده شد؛ سپس با ۶۰۰ ng/µl از پلاسمید حلقوی pUcD2.hygro.PTS2-EGFP با استفاده از کیت Lipofectamine 2000 (Invitrogen) ترانسفکت گردید. ترانسفکشن ۶ ساعت در دمای $^{\circ}C$ ۳۷ در محیط عاری از سرم Opti-MEM (Gibco) صورت پذیرفت. سلول‌ها سپس در محیط کشت مخصوص سلول‌های P19 قرار گرفت و به سلول‌ها فرصت تکثیر داده شد. یک روز بعد، ۵۰۰۰ سلول در دیش باکتریایی cm^2 ۱۰ با غلظت ۴۰۰ µg/ml هیگرومایسین B کاشته شد. سلول‌ها به مدت ۱۰ روز در این محیط کشت داده شد و محیط کشت بعد از ۵ روز تعویض گردید. بعد از گذشت ۱۰ روز، کلنی‌هایی جدا از هم تشکیل شد که قابل جدا شدن از دیش و کاشته شدن مجدد در یک دیش جدید بود. برای ایزوله کردن کلونی‌های سلولی منفرد، عمل برداشتن کلنی (Colony Pick up) صورت پذیرفت.

ایمونوسیتوشیمی: سلول‌های P19 روی Coverslipهای پوشیده شده با ژلاتین ۰/۱ درصد رشد داده شدند. جهت رنگ آمیزی ابتدا سلول‌ها با بافر PBS شستشو داده شده، به مدت ۵ دقیقه در غلظت ۲۰ µg/ml Digitonin (Sigma) حل شده در بافر PBS نفوذپذیر گردید. متعاقب آن، سلول‌ها دو بار با بافر PBS شستشو داده شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در پارافرمالدهید ۴ درصد در دمای اتاق تثبیت گردید. بار دیگر، سلول‌ها در بافر PBS شستشو داده شد و به مدت یک ساعت با محلول Blocking ۲۰ درصد BSA/PBS بلوکه شد. سلول‌ها در $^{\circ}C$ ۳۷ با آنتی‌بادی اولیه (Rabbit anti Catalase; Abcam: ab1877) به مدت ۲ ساعت انکوبه شد (غلظت نهایی آنتی‌بادی ۱/۳۰۰)؛ سپس بار دیگر با بافر PBS شستشو داده شد؛ آن گاه به مدت ۲ ساعت دیگر با آنتی‌بادی ثانویه (Texas red conjugated donkey anti rabbit; Amersham: N2034) (غلظت نهایی آنتی‌بادی ۱/۲۰۰۰) در $^{\circ}C$ ۳۷ انکوبه شد. در رابطه با رنگ آمیزی با آنتی‌بادی SSEA-1، بعد از افزودن پارافرمالدئید به مدت ۳۰ دقیقه و شستشوی سلول‌ها با بافر PBS، به مدت ۴۵ دقیقه در محلول Blocking واجد ۳ mg/ml از BSA قرار داده شد؛ سپس با آنتی‌بادی اولیه (Mouse anti SSEA-1; Chemicon: MAB4301) (غلظت نهایی آنتی‌بادی ۱/۲۰۰) به مدت ۲ ساعت انکوبه گردید. بعد از شستشوی سلول‌ها با بافر PBS با آنتی‌بادی ثانویه (FITC conjugated goat anti mouse; Sigma: F9259) به مدت ۱ ساعت انکوبه شد و بعد از شستشوی آن با بافر PBS، سلول‌ها زیر میکروسکوپ مشاهده شد.

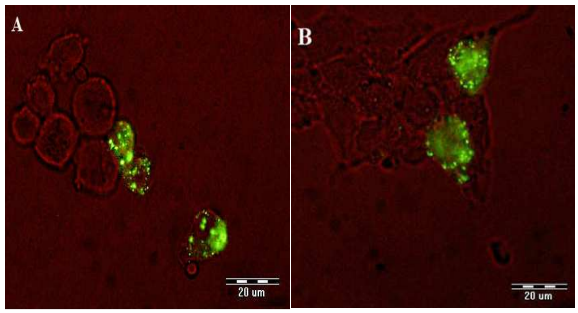
شناسایی بیان EGFP: دو روز پس از ترانسفکشن، سلول‌ها با بافر PBS شستشو داده شد و در پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت ۳۰ دقیقه تثبیت گردید. فلورسانسی EGFP در سلول‌ها توسط میکروسکوپ فلورسنت (Olympus) مشاهده گردید.

www.mui.ac.ir

یافته‌ها

بررسی مرفولوژیک سلول‌های ترانسفکت شده:

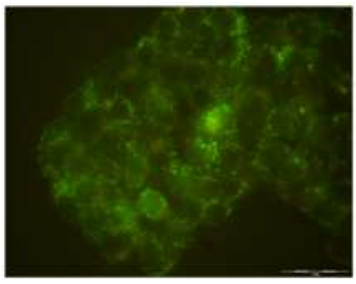
بررسی سلول‌های P19 ترانسفکت شده به صورت گذرا (Transient) نشان داد که کفایت (Efficiency) ترانسفکشن در این سلول‌ها حدود ۱۵ درصد بوده است (شکل ۱).



شکل ۱. کفایت ترانسفکشن سلول‌های P19.

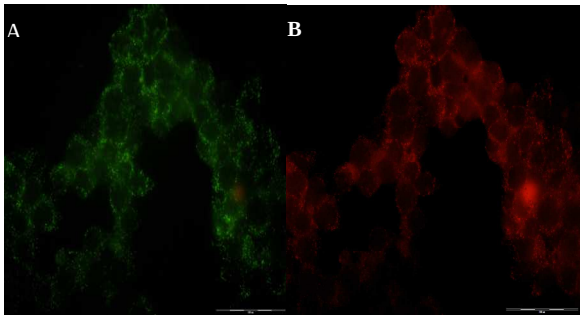
A و B دو میدان دید مختلف از سلول‌های ترانسفکت شده است. نقاط سبز رنگ همان پراکسی‌زوم‌ها می‌باشد. بار ۲۰ میکرومتر بوده است.

به دنبال استفاده از آنتی‌بیوتیک و جداسازی کلنی‌های سلولی مقاوم به آنتی‌بیوتیک، فلورسانسی این سلول‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت و در نهایت دو گروه سلولی مقاوم به آنتی‌بیوتیک، که به صورت پایداری رنگ سبز را از خود ساطع می‌نمود، انتخاب گردید. شکل ۲، الگوی دانه دانه (Punctuate) فلورسنت را در یکی از گروه‌های سلولی P19 پایدار نشان می‌دهد.



شکل ۲. تصویر سلول‌های P19 پایدار که وجود ذرات ریز و براق، نشان‌دهنده‌ی جایگاه پراکسیزومی در سلول است.
بار ۲۰ میکرومتر بوده است.

نتایج حاصل از ایمونوسیتوشیمی علیه کاتالاز، به عنوان یک مارکر پراکسی‌زوم، ورود پروتئین PTS2-EGFP را به داخل پراکسیزوم تأیید کرد (شکل ۳).



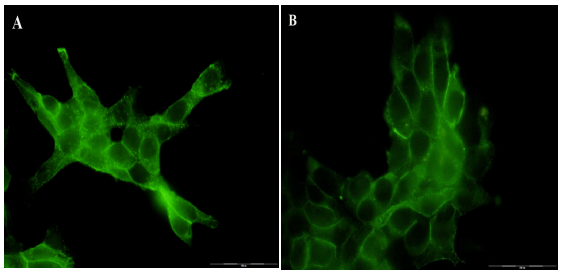
شکل ۳. ورود PTS2-EGFP به داخل پراکسی‌زوم‌ها
A: تصویر دانه‌های فلورسانس در داخل سلول‌ها بعد از ترانسفکشن
B: رنگ آمیزی علیه کاتالاز.
بار ۲۰ میکرومتر بوده است.

بررسی خصوصیات پرتوانی سلول‌های ترانسفکت شده:

از آن جا که دستکاری‌های ژنتیکی بر روی سلول‌های بنیادی ممکن است منجر به تغییر خصوصیات پرتوانی این سلول‌ها شود، بررسی صفات پرتوانی سلول‌های P19 پایدار تولید کننده‌ی PTS2-EGFP نیز در این تحقیق صورت پذیرفت.

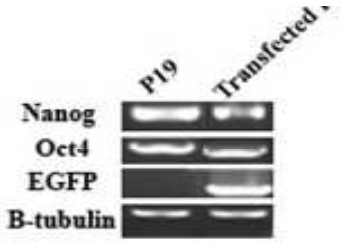
(Stage Specific Embryonic Antigen 1) SSEA1 یک مارکر سطحی سلول‌های پرتوان P19 است که بیان آن در سطح سلول‌های P19 نشانگر حفظ حالت پرتوانی سلول‌های P19 می‌باشد. شکل ۴ نمایشگر رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی سلول‌های P19 معمولی و ترانسفکت شده برای مارکر سطحی SSEA-1 است. همان طور که در شکل ۴ دیده می‌شود، سلول‌های P19 پایدار تولید کننده‌ی PTS2-EGFP نیز همانند سلول‌های P19 مارکر SSEA-1 را در سطح خود بیان نمود.

www.mui.ac.ir



شکل ۴ رنگ آمیزی علیه SSEA-1
A: سلول‌های P19 معمولی
B: سلول‌های P19 ترانسفکت شده.
بار ۲۰ میکرومتر بوده است.

همچنین با استخراج RNA از سلول‌های ترانسفکت شده‌ی P19 و انجام آزمایش RT-PCR روی آن‌ها، مشاهده شد که هیچ تغییری در میزان بیان دو ژن Oct4 و Nanog، که فاکتورهای رونویسی بیان شونده در سلول‌های پرتوان P19 می‌باشد، پس از ترانسفکشن این سلول‌ها مشاهده نمی‌شود که مؤید حفظ حالت پرتوانی آن‌ها است (شکل ۵).



شکل ۵. نمایش RT-PCR ژن‌های Oct4، Nanog و EGFP

بحث

پراکسی‌زوم‌ها اندامک‌هایی هستند که در تمام یوکاریوت‌ها یافت می‌شوند و دارای وظایف مختلفی می‌باشند که از آن جمله می‌توان به اکسیداسیون اسیدهای چرب بلند زنجیر و شاخه‌دار اشاره نمود. اهمیت وجود پراکسی‌زوم‌ها ناشی از وجود دسته‌ای از بیماری‌های وراثتی به نام بیماری‌های پراکسی‌زوم می‌باشد. در همین راستا، مطالعه‌ی مکانیسم‌های ملکولی بسته بندی پراکسی‌زوم دارای اهمیت فراوانی است (۶). یکی از مسائلی که هنوز به صورت مبهم باقی مانده است، بررسی نقش پراکسی‌زوم‌ها در هنگام فرایند تمایز سلول‌ها می‌باشد. به ویژه، تمایز سلولی به سلول‌های عصبی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است؛ چرا که با دانستن مکانیسم‌های تمایز سلولی به نرون‌ها می‌توان در آینده رشد و پیشرفت فرایند بیماری‌های نورودژنراتیو را در بیماران مبتلا کنترل نمود. همان طور که پیشتر ذکر شد، خصوصیات ذاتی موجود در سلول‌های P19، آن‌ها را برای بررسی وقایع تکوین ارزشمند می‌سازد. این سلول‌ها به راحتی می‌توانند از طریق دست‌کاری‌های ساده در محیط کشت و افزودن داروهایی مثل رتینوئیک اسید و DMSO به سمت تمایز القا شوند. سلول‌های P19 راحت رشد می‌کنند و در شرایط تمایز نیافته باقی می‌مانند اما آن‌ها می‌توانند به نحو کارآمدی برای تمایز القا شوند که از طریق دست‌کاری‌های ساده‌ی محیط کشت این مسأله امکان پذیر است. در آخر، ترکیب ژنتیکی سلول‌ها می‌تواند به راحتی دست‌کاری شود که این مسأله یا از طریق انتخاب گونه‌های موتان یا با انتخاب کلون‌هایی که ژن ترانسفکت شده به صورت پایدار در ژنوم آن‌ها ادغام شده، انجام پذیر است (۴). بنابراین، مدل‌های سلولی مناسبی جهت مطالعات مولکولی و سلولی می‌باشند (۴).

از آن جا که رنگ آمیزی سلول‌ها، آن‌ها را دستخوش مرگ و میر می‌کند، با انتقال پلاسمیدی که واجد نشانگر EGFP است، سلول‌های زنده واجد تابش سبز رنگ فلورسانت خواهند بود که با توجه به وجود سیگنال PTS2، پلاسمید مورد نظر به سمت پراکسی‌زوم هدایت می‌شود؛ بنابراین قادر خواهیم بود

www.mui.ac.ir

که در حین تمایز سلول‌های P19 که بیان پایدار پلاسمید ذکر شده را دارند، تغییرات ایجاد شده در پراکسی‌زوم‌ها را مورد بررسی قرار دهیم.

بیان موقت پلاسمید ذکر شده پیشتر در سلول‌های Vero و CHO جهت بررسی کینتیک و بهینه سازی بیان این پلاسمید در این رده‌های سلولی توسط قدرت نما و همکاران (۹) به انجام رسید. بیان پایدار آن نیز پیشتر در سلول‌های CHO و فیبروبلاست پوست جهت بررسی بیان ژن‌های مختلف *PEX* به انجام رسیده است (۱۱-۱۰، ۶). اما از آن رو که جهت بررسی فعالیت پراکسی‌زوم در هنگام فرایند تمایز از این گونه سلول‌ها نمی‌توان استفاده نمود، در تحقیق حاضر برای اولین بار از سلول‌های تراتوکارسینومای موشی P19 استفاده شد و رده‌ی سلولی پایدار بیان کننده‌ی پلاسمید PTS2-EGFP به دست آمد؛ از آن جایی که این سلول‌ها خصوصیت سلول‌های بنیادی را دارا هستند و توانایی تمایز به دیگر انواع سلول‌ها مانند سلول‌های عصبی را دارند. می‌توان در آینده از این سلول‌ها جهت بررسی‌های بعدی بر روی پراکسی‌زوم در حین تمایز به سلول‌های مختلف استفاده کرد. از آن جا که انتقال یک ژن با منشأ خارجی در یک رده‌ی سلولی می‌تواند موجب تغییر در خصوصیات آن رده‌ی سلولی شود، در مطالعه‌ی حاضر با بررسی بیان ژن‌های پرتوانی مثل *OCT4* و *NANOG* در سطح RNA و SSEA-1 در سطح پروتئین در سلول‌های P19 ترانسفکت شده و مقایسه‌ی آن با سلول‌های P19 معمولی، می‌توان این نتیجه را گرفت که این رده‌ی سلولی پایدار، تمامی خصوصیات سلول‌های پرتوان P19 را دارا می‌باشد و در واقع همان سلول P19 عادی است؛ با این تفاوت که بیان پایدار PTS2- EGFP را از خود بروز می‌دهد. گرچه در مطالعات قبلی، دانشمندان از پروتئین‌های GFP- PTS1 برای نمایش انتقال پراکسی‌زومی در *in vivo* استفاده کرده‌اند ولی نتایج حاضر نیز نشان می‌دهد که تصاویر فلورسنت EGFP می‌تواند جهت ارزیابی بازده ورود پراکسی‌زومی استفاده شود. بازده ورود پروتئین‌ها به پراکسی‌زوم نیاز به دست‌ورزی و مهارت محققان دارد تا طبیعت شکننده‌ی پراکسی‌زوم‌ها را جبران کند. از تکنیک EGFP می‌توان جهت تولید پروتئین‌های ادغام شده (Fusion Protein) استفاده نمود و موقعیت سیتوزولی و پراکسی‌زومی این پروتئین‌های ادغام شده در *in vivo* را مورد بررسی قرار داد. یکی دیگر از مزایای این روش، مطالعه‌ی مستقیم پراکسی‌زوم‌ها بدون استفاده از روش‌های وقت‌گیر رنگ آمیزی سلولی است. بنابراین با استفاده از این روش می‌توان سلول‌های زنده را بدون هر گونه تیمار در زیر میکروسکوپ بررسی نمود. این تکنیک می‌تواند مسیر جدیدی برای ارزیابی بازده پروتئین‌های گوناگون پراکسی‌زومی باشد که اطلاعات حاصل از آن می‌تواند در جهت بررسی بیشتر مکانیسم مولکولی پراکسی‌زومی در تمایز سلول‌های بنیادی مؤثر باشد (۴).

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از کلیه‌ی پرسنل پژوهشکده‌ی رویان پایگاه تحقیقاتی اصفهان تقدیر و تشکر می‌نمایند.

References

1. Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN, Wheeler CJ, Tsai YJ, Border R, et al. Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. J Biol Chem 1994; 269(4): 2550-61.
2. Mitrovic T. Gene transfer systems. Medicine and

www.mui.ac.ir

Biology 2003; 10(3): 101-5.
3. Rossant J, McBurney MW. The developmental potential of a euploid male teratocarcinoma cell line after blastocyst injection. J Embryol Exp Morphol 1982; 70: 99-112.
4. Mcburney MW. P19 embryonal carcinoma cells. Int I Un BioI 1993; 37(1): 135-40.
5. Legakis JE, Terlecky SR. PTS2 protein import into mammalian peroxisomes. Traffic 2001; 2(4): 252-60.
6. Ghaedi K, Tamura S, Okumoto K, Matsuzono Y, Fujiki Y. The peroxin pex3p initiates membrane assembly in peroxisome biogenesis. Mol Biol Cell 2000; 11(6): 2085-102.
7. Saravolac EG, Ludkovski O, Skirrow R, Ossanlou M, Zhang YP, Giesbrecht C, et al. Encapsulation of plasmid DNA in stabilized plasmid-lipid particles composed of different cationic lipid concentration for optimal transfection activity. J Drug Target 2000; 7(6): 423-37.
8. Brown LA, Baker A. Peroxisome biogenesis and the role of protein import. J Cell Mol Med 2003; 7(4): 388-400.
9. Ghodratnama R, Karbalaii K, Ghaedi K, Baharvand H, Nasr-Esfahani MH. Optimization of PTS2-EGFP Expression in CHO and Vero Cells. Yakhteh Medical Journal 2007; 9(3):170-5.
10. Otera H, Setoguchi K, Hamasaki M, Kumashiro T, Shimizu N, Fujiki Y. Peroxisomal targeting signal receptor Pex5p interacts with cargoes and import machinery components in a spatiotemporally differentiated manner: conserved Pex5p WXXXF/Y motifs are critical for matrix protein import. Mol Cell Biol 2002; 22(6): 1639-55.
11. Maxwell M, Bjorkman J, Nguyen T, Sharp P, Finnie J, Paterson C, et al. Pex13 inactivation in the mouse disrupts peroxisome biogenesis and leads to a Zellweger syndrome phenotype. Mol Cell Biol 2003; 23(16): 5947-57.

www.mui.ac.ir

Journal of Isfahan Medical School **Original Article**

Vol 28, No 110, October 2010 Received: 3.11.2009 Accepted: 15.8.2010

Creation of a Stable P19 Cell Line Producing PTS2-EGFP

Marziyeh Mojbafan[1], Kamran Ghaedi PhD[2], Shahnaz Razavi PhD[3], Fereshteh Karamali MSc[4], Khadijeh Karbalaii MSc[4], Somayeh Tanhaie MSc[4], Farzaneh Rabiee[4], Mohammad Hossein Nasr Esfahani PhD[5], Hossein Baharvand PhD[6]

Abstract

Background: P19 cells are mouse embryonic carcinoma cells which contain pluripotent ability, like stem cells, to differentiate into different cell lines. There are several properties for this cell line that make it a valuable cell model for study of developmental stages.

Methods: At the first step, PTS2-EGFP coding sequence which was cloned in pUcD2.hygro vector was used for transfection in to P19 cells. As the plasmid contained hygromycin ($Hygro^r$) resistance gene, stable cells were selected using hygromycin as an antibiotic. Stable transformed cells were characterized by RT-PCR and immunostaining analyses.

Findings: RT-PCR results indicated EGFP was expressed in these cells. Moreover immunocytochemical analysis of the cells confirmed the preserved pluripotency states of transfected cells.

Conclusion: As P19 Cells are able to differentiate into several cell lines, using this stable cell line we will able to chase the molecular kinetics of peroxisomes.

Key words: Lipofection, P19, Plasmid, RT-PCR, Peroxisome.

[1] MSc Student, Department of Biology, School of Science, The University of Isfahan, Isfahan, Iran.
[2] Assistant Professor, Department of Biology, School of Science, The University of Isfahan and Department of Cell and Molecular Biology, Royan Institute for Animal Biotechnology, Iranian Academic Center for Education, Culture & Research (ACECR), Isfahan, Iran.
[3] Associate Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
[4] Department of Cell and Molecular Biology, Royan Institute for Animal Biotechnology, Iranian Academic Center for Education, Culture & Research (ACECR), Tehran, Iran.
[5] Associate Professor, Department of Developmental Biology, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, Iranian Academic Center for Education, Culture & Research (ACECR), Isfahan, Iran.
[6] Associate Professor, Department of Stem Cells and Developmental Biology, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, Iranian Academic Center for Education, Culture & Research (ACECR), Tehran, Iran.
Corresponding Author: Kamran Ghaedi PhD, Email: kamranghaedi @royaninstitute.org